

K

009060673 **Image available**

WPI Acc No: 1992-188063/199223

Polyethylene glycol modified arginine deaminase prepn. - by covalently bonding arginine deiminase and polyethylene glycol, useful as anticancer drug

Patent Assignee: NIPPON MINING CO (NIHA)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4121187	A	19920422	JP 90239387	A	19900910	199223 B
JP 3209338	B2	20010917	JP 90239387	A	19900910	200161

Priority Applications (No Type Date): JP 90239387 A 19900910

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 4121187	A		6	C12N-009/78	
JP 3209338	B2	10		C12N-009/78	Previous Publ. patent JP 4121187

Abstract (Basic): JP 4121187 A

Polyethylene glycol (PEG) modified arginine deaminase (I) which is chemically modified with PEG or its deriv. is new. It is prepd. by covalent bonding arginine deiminase and PEG or its deriv. High blood stable anticancer drug which contains PEG modified arginine deaminase as an active component.

Pref. (I) is of formula (A) (where AD is arginine daiminase, n is opt. numerical No. of av. mw. of PEG 1000-10000). Arginine deiminase has physico-chemical properties of (a) it hydrolysates amidino gp. of L-arginine to form L-citrulline and ammonia, (b) optimum pH 6.0-7.5, (c) stable pH 4.5-9.0, (d) optimum temp. ca 50 deg.C, (e) km value ca 0.2 mM, (f) pI ca 4.7, (g) mw. ca 45000 (SDS-polyacrylamide gel E.P.), ca 90000 (gel filtration HPLC).

USE/ADVANTAGE - The cpd. has equal anticancer effect as that of arginine deiminase, the blood stability is raised, antigenicity is reduced, furthermore it is low toxic, it can be used for an anticancer drug, advantageously.

Derwent Class: A96; B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/78

International Patent Class (Additional): A61K-037/54; A61K-038/46;

A61P-035/00; C12N-015/09; C12N-015/55; C12N-009/78; C12R-001-01

⑫ 公開特許公報(A) 平4-121187

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成4年(1992)4月22日

C 12 N 9/78
A 61 K 37/54
// C 12 N 15/55
(C 12 N 9/78
C 12 R 1:01)

ZNA
ADU7823-4B
8317-4C

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全6頁)

⑥ 発明の名称 ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

⑦ 特 願 平2-239387

⑧ 出 願 平2(1990)9月10日

⑨ 発 明 者 高 久 春 雄 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 日本鉱業株式会社内

⑩ 出 願 人 日本鉱業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号

⑪ 代 理 人 弁理士 藤野 清也

明 細 書

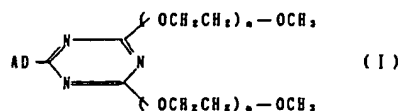
1. 発明の名称

ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) ポリエチレングリコールまたはその誘導体により化学修飾されたポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(2) 式(1)



で表される請求項(1)記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(式中、ADはアルギニンデイミナーゼを表し、nはポリエチレングリコールの平均分子量が1,000～10,000となる任意の正の整数を表す)

- (3) アルギニンデイミナーゼが次の理化学的性質

を有する請求項(1)または(2)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(イ) L-アルギニンのアミジノ基を加水分解してL-シトルリンとアンモニアを生成する

(ロ) 至適pH: 6.0～7.5

(ハ) 安定pH: 4.5～9.0

(ニ) 至適温度: 約50℃

(ホ) km値: 約0.2mM

(ヘ) 等電点(pI): 約4.7

(ト) 分子量: 約45,000
(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

: 約90,000
(ゲル透過HPLC法による)

- (4) アルギニンデイミナーゼがマイコプラズマ・アルギイニ(Mycoplasma arginini)由来のものである請求項(1)～(3)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

- (5) アルギニンデイミナーゼが第1図のアミノ酸

配列を含有するものである請求項(1)~(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(6) アルギニンデイミナーゼとポリエチレングリコールまたはその誘導体とを反応させて両者を共有結合させることを特徴とするポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼの製造法

(7) ポリエチレングリコール誘導体として2,4-ビス(オ-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンを用いることを特徴とする請求項(5)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼの製造法

(8) 請求項(1)~(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規かつ有用なポリエチレングリコ

ール修飾アルギニンデイミナーゼ、およびその製造法に関する。さらに本発明はこのポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤に関する。

(従来の技術)

近年、遺伝子工学の進歩やタンパク質を大量精製する技術の向上により、酵素や生理活性物質などを医療として使用することが可能となった。癌治療の分野においても、癌細胞の栄養要求性に基づいた酵素療法(Nature誌、229, 168(1971), Br. J. Cancer誌、19, 379(1965))が注目されている。アルギニンデイミナーゼ(EC3.5.3.6)は、癌細胞の増殖に必須であるL-アルギニンをL-シトルリンとアンモニアに加水分解することにより、in vitroにおいて強い制癌作用を示すことが知られている(Cancer Res誌、in press)。しかしながら、アルギニンデイミナーゼには、酵素療法における固有な性質としての循環血液中からの急速な消失(クリアランス)の問題と、異種

タンパク質としての抗原性の問題が予想されている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明はアルギニンデイミナーゼのこのような欠点を解決するためになされたものであって、アルギニン分解能を保持し、血中安定性を向上させたアルギニンデイミナーゼの化学修飾体を製造し、これを制癌剤として利用しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、アルギニンデイミナーゼの化学修飾に使用する至適な合成高分子の探索研究を行った。

その結果、ポリエチレングリコールで化学修飾したアルギニンデイミナーゼが優れた性質を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

ポリエチレングリコールは、それ自体毒性が低く、免疫原性がなく、また、水溶液中で酵素の立体構造に影響を与えないので酵素活性を保持しうる修飾試薬である。とりわけ、平均分子量1,000

~10,000の該修飾試薬は該酵素の安定化と免疫原性の抑制に優れた効果を発揮することがわかった。

また、該修飾体は次の方法によって調製される。

アルギニンデイミナーゼは、いかなる生物由来のものを使用してもよい。たとえば、マイコプラズマ、シュードモナス、ストレプトコッカス等の微生物を例に挙げることができる。特に好適な菌株は、菌発酵研究所から入手することができるマイコプラズマ アルギニイニ(M.arginini) (IFO 14476, ATCC23838 またはNCTC10129)である。

本発明のアルギニンデイミナーゼは上記マイコプラズマの菌体抽出液から、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィーによってアルギニンデイミナーゼを分離精製することができる。また、遺伝子工学的手法を用いて生産することもできる。

本発明に用いられる特に好ましいアルギニンデイミナーゼの一つは次の理化学的性質を有する。

(イ) 作用

L-アルギニンのアミノ基を加水分解してL-シトルリンとアンモニアを生成する。

(ロ) 至適 pH: 6.0 ~ 7.5

(ハ) 安定 pH: 4.5 ~ 9.0

(ニ) 至適温度: 約 50℃

(ホ) km 値: 約 0.2 mM

(ヘ) 等電点 (pI): 約 4.7

(ト) 分子量: 約 45,000
(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

: 約 90,000
(ゲル濾過 HPLC 法による)

(チ) N 末端からのアミノ酸配列

Ser-Val-Phe-Asp-Ser-Lys-Phe-Lys-Gly-Ile-His-Val-Tyr-Ser-Glu-

さらに、このアルギニンデイミナーゼは第 1 図に示すアミノ酸配列を含有する。

また、修飾に使用するポリエチレングリコール (PEG) は、蛋白質と共有結合しうるものであれば、

いかなるものを用いてもよい。例えば、末端にカルボキシル基を有するポリエチレングリコールと N-ヒドロキシスクシンイミドとをカルボジイミドを用いて脱水結合して得られる活性化 PEG などが挙げられる。特に好適なものは、塩化シアヌル (2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン) に 2 つのポリエチレングリコール (平均分子量約 5000) 鎖を結合させた活性型 PEG₂ (2,4-ビス (o-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン) である。該活性型 PEG₂ は常法に従い、合成・精製される。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼは上記の活性型 PEG₂ のトリアジン環と、前記のアルギニンデイミナーゼの分子表面に存在するアミノ基とを結合させることにより得ることができる。

尚、該修飾体の抗癌活性は未修飾アルギニンデイミナーゼと同等である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニ

ンデイミナーゼは、試験例に示すように、優れた血中安定性を有することから、抗癌剤として有用である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼは、通常の製剤用担体、賦形剤あるいは希釈剤等を用いて慣用の方法で製剤とすることができる。この剤型としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤等として経口投与したり、あるいは静注、筋注、動注等の注射剤の形として投与したり、また坐剤の形にして投与したりすることができる。

投与量は、症状や投与対象者の年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人 1 日当たり 10 ~ 500 mg であり、これを 1 日 1 回または数回に分けて投与する。

該修飾体の毒性については、これをマウスに経口的あるいは尾静脈内に 1 g/kg 投与しても死亡例がなく、また投与後解剖した所見によると各臓器には何等の異常が観察されず、きわめて安全で

あることが分かった。

また、抗原性試験の結果、モルモットにおいて抗体生産性は著しく抑制され、免疫原性を減少していることがわかった。

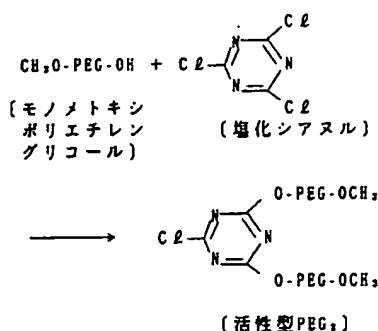
実施例

次に、本発明を実施例を示して具体的に説明する。

実施例 1

ポリエチレングリコール (PEG)-修飾アルギニンデイミナーゼの調製

(I) 2,4-ビス (o-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン (活性型 PEG₂) の合成法



無水炭酸ナトリウム(10g)とモレキュラー
シーグ3A(5g)を含む乾燥ベンゼン100ml
にモノメトキシポリエチレングリコール(平均分
子量5000)(20g)と塩化シアヌル(365mg)
を添加し、80℃で48時間還流した。次に反応
液に石油エーテル200mlを添加し、生成した活
性型PEG₂を沈澱させた。この沈澱物を、ベンゼン
-アセトン(1:1)200mlに溶解し、石油エ
ーテル200mlで沈澱させる精製操作を3回繰り
返し、さらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー
により一本鎖の活性型PEG₂を除去したのち、凍結

乾燥して活性型PEG₂(10.3g)を得た。

(2) アルギニンデイミナーゼの調製

マイコプラズマ・アルギニニ(*M. arginini*)
(IFO 14476株)を30L培養液(PPL0 broth w/o
CV (Difco) 21g、L-アルギニン10g、馬血
清200ml、25%新鮮イーストエキス100ml、
0.4%フェノールレッド液5ml及び蒸留水700ml
の組成よりなり、pH7.0に調整)に接種し、5%
CO₂インキュベーター内で37℃において2日間
静置培養した。次に得られた培養液を7000rpmで
20分間遠心することにより菌体30gを集菌し、
これをリン酸緩衝液(pH7.4)を含む生理食塩
液(PBS)で2回洗浄後、10mMリン酸緩衝液(pH
7.0)200mlに懸濁した。この懸濁液を超音波
処理してその中に含まれる菌体を破碎し、遠心分
離によって不溶物を除き、得られた上清をマイコ
プラズマ・アルギニニ(*M. arginini*)の菌体抽
出液とした。

上記で得られた菌体抽出液を出発材料として、

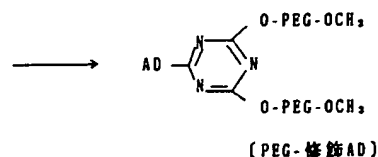
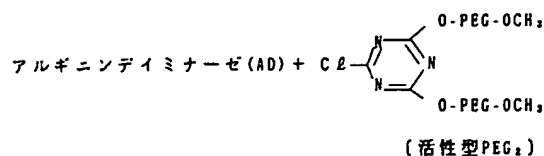
通常用いられるカラムクロマトグラフィー(ゲル
濾過、陰イオン交換、アルギニン・アフィニティ
カラム)を行うことにより、アルギニンデイミナ
ーゼ0.32gを得た。

このときの結果を第1表に示す。

第 1 表				
精製工程	総蛋白 (g)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収 率 (%)
菌体抽出液	1.36	1.63×10 ⁴	12.0	(100)
Sephacryl S-300HR	0.61	1.60×10 ⁴	26.2	98
DEAE- Toyopearl 650s	0.38	1.47×10 ⁴	38.7	90
Arginine- Sephacrose 4B	0.32	1.41×10 ⁴	44.5	86

このアルギニンデイミナーゼは、前記した理比学
的性質を有し、第1図に示したアミノ酸配列を有
していた。

(3) PEG-修飾アルギニンデイミナーゼの調製



(2)で調製したアルギニンデイミナーゼ(25mg)
に0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)5ml
を添加し、37℃で30分間攪拌した。氷冷した
1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)5mlを添
加し、反応を停止させた後、MX-50(アミコン社、
分子量5万カット)を用いた限外濾過により未反
応の活性化PEG₂を除去した。得られたPEG修飾ア
ルギニンデイミナーゼについて、リン酸緩衝液
(pH7.4)を含む生理食塩水(PBS)に対して透析し
た後、収量、比活性およびアミノ基の修飾率を測

定した。

なお、蛋白定量は牛血清アルブミンを標準として通常のビウレット法により、酵素活性は生成したシトルリンをArchibaldの方法(J.Biol.Chem.誌、156、121(1944))により測定した。このとき、1分間に1 μ molのシトルリンを生産するアルギニンデイミナーゼ活性を1単位(U)とし、比活性は酵素1 μ g当たりの単位数(U/ μ g蛋白)で表わした。

また、PEG-修飾アルギニンデイミナーゼのアミノ基修飾率は未修飾アルギニンデイミナーゼを対照として2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いたSatakeらの方法(J.Biochem.誌、47、654(1960))により測定した。

このときの結果を第2表に示す。

第 2 表	
項 目	数 値
収 量	16.0 (mg蛋白)
比活性	25.5 (U/ μ g蛋白)
アミノ基修飾率	51 (%)

中アミノ酸濃度の測定は、各アミノ酸をケイ光試薬(NBD-F4,フルオロー7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)を用いて誘導体化したのち、高速液体クロマトグラフィーにより行った。

このときの結果を第3表に示す。

実施例2

注射用酵素製剤の調製

実施例1-(3)で得られたPEG-修飾アルギニンデイミナーゼをPBSを用いて希釈し、濾過滅菌して25U/mlの注射用酵素製剤を調製した。

なお、実施例1-(2)で得られた未修飾アルギニンデイミナーゼを実施例2と同様にして注射用酵素製剤を調製し、比較試験の対照として使用した。

試験例

マウスにおける血中安定性の向上

7週齢の雄性CDF₁マウス6匹を無作為に対照群3匹、試験群3匹に群分けした。そして、実施例2で調製した未修飾アルギニンデイミナーゼ製剤を対照群に、PEG-修飾アルギニンデイミナーゼ製剤を試験群に、それぞれ0.2ml(5U/マウス)ずつ尾静脈内に投与し、投与1日後、3日後、8日後および15日後に眼窩静脈より採血を行った。

各製剤の血中安定性は、血中アルギニン濃度とシトルリン濃度の経時変化を指標した。なお、血

第 3 表

時 間	未修飾アルギニンデイミナーゼ アルギニン (μ M)	PEG-修飾アルギニンデイミナーゼ アルギニン (μ M)	シトルリン (μ M)
投与前	177.0	68.4	77.6
投与後			
1日	0	253.1	291.0
3日	0	289.6	1245.9
8日	117.3	65.7	340.6
15日	91.3	135.5	109.9

第 1 図 - 1

TCT GTA TTT GAG AGT AAA TTT AAA GGA ATT CAC GTT TAT TCA GAA ATT
 Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile
 1 5 10 15
 GCT GAA TTA GAA TCA GTT CTA GTT CAC GAA CCA GCG GAA ATT CAC
 Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp
 20 25 30
 TAT ATT ACA CCA GCT AGA CTA GAT GAA TTA TTA TTC TCA GCT ATC TTA
 Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu
 35 40 45
 GAA AGC CAC GAT GCT AGA AAA GAA CAC AAA CAA TTC CTA GCA GAA TTA
 Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Ile Glu Leu
 50 55 60
 AAA GGA AAC GAG ATC AAT GTT GTT GAA TTA ATT GAT TTA GTT GCT GAA
 Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala Glu
 65 70 75 80
 ACA TAT GAT TTA GCA TCA CAA GAA GCT AAA GAC AAA TTA ATC GAA GAA
 Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Glu Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu Glu
 85 90 95
 TTT TTA GAA CAC TCA GAA CCA GTT CTA TCA GAA CAC AAA GTA GTT
 Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val Val
 100 105 110
 GTA AGA AAC TTC TTA AAA GCT AAA AAA ACA TCA AGA GAA TTA CTA GAA
 Val Arg Asn Phe Leu Lys Ile Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val Glu
 115 120 125
 ATC ATC ATC GCA GCG ATC ACA AAA TAC GAT TTA GCT ATC GAA CCA GAT
 Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ile Asp
 130 135 140

この結果、試験群では対照群にくらべて血中のアルギニン濃度が長期間に亘り低減し、シトルリン濃度が増加しているため、PEG-1 修飾アルギニンデヒミナーゼは血中で長期間安定にその作用を維持すると判断される。

〔発明の効果〕

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼは、アルギニンデヒミナーゼと同等の制癌活性を示し、しかも血中安定性が向上し、抗原性が減少し、しかも低毒性であるので制癌剤として有用に利用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明に好適に用いられるアルギニンデヒミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列及びその塩基配列を示す。

出願人 日本鉱業株式会社
 代理人 藤野清也
 代理人 宮田広豊

第 1 図 - 2

CAC GAA TTA ATC GTT CAC CCA ATC GCA AAC CTA TAC TTC ACA GCT GAC
 His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asn
 145 150 155 160
 GCA TTT GCA TCA GTA GCT AAT GGT GTA ACA ATC CAC TAC ATC GCT TAC
 Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr
 165 170 175
 AAA GTT ACA GAA GGT GAA ACA TTA TTC TCA AGA TTT GTA TTC TCA AAT
 Lys Val Arg Glu Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser Asn
 180 185 190
 CAC GCT AAA CTA ATT AAC ACT CCA TCA TAC TAC CAC GCT TCA CTA AAA
 His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys
 195 200 205
 TTA TCA ATC GAA GGT GCG CAC CTA TTT ATC TAC AAC AAT GAC ACA TTA
 Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr Leu
 210 215 220
 GTA GTT GGT GTT TCT GAA AGA ACT CAC TTA CAA ACA GTT ACT TTA TTA
 Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Val Thr Leu Leu
 225 230 235 240
 GCT AAA AAC ATT GTT GCT AAT AAA GAA TGT GAA TTC AAA GCT ATT GTT
 Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile Val
 245 250 255
 GCA ATT AAC GTT CCA AAA TCA ACA AAC TTA ATC CAC TTA GAC ACA TCA
 Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270
 CTA ACA ATC TTA CAC AAC CAC AAA TTC CTA TAC TCA CCA ATC GCT AAT
 Leu Thr Met Leu Asn Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
 275 280 285
 GAC GTA TTT AAA TTC TCA GAT TAT GAC TTA CTA AAC GCT CCA GCA
 Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ile Glu
 290 295 300

第 1 図 - 3

CCA GAA CCA GTT GAA AAC GGA TTA CCT CTA GAA CCA TTA TTA CAA TCA
 Pro Glu Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ser
 305 310 315 320
 ATC ATT AAC AAA AAA CCA GTT TTA ATT GCT ATC CCA GGT GAA GGT GCT
 Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly Ala
 325 330 335
 TCA CAA ATC GAA ATC GAA ACA GAA ACA CAC TTC GAT GCT ACA AAC TAC
 Ser Glu Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350
 TTA GCA ATT ACA CCA GGT GTT GTA ATT GGT TAC TCA GGT AAC GAA AAA
 Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys
 355 360 365
 ACA AAC GCT GCT CTA GAA GCT GCA GCG ATT AAA GTT GTT CCA TTC CAC
 Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe His
 370 375 380
 GGT AAC CAA TTA TCA TTA GGT ATG GGT AAC GCT GGT TGT ATG TCA ATC
 Gly Asn Glu Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400
 CCT TTA TCA GGT AAA GAT GTT AAC TCA
 Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405